

立体構造解析に基づく組換え型タンパク質の安定性の研究

著者	堀井 克紀
号	2668
発行年	2000
URL	http://hdl.handle.net/10097/7941

		ほり い かつ のり	
氏 名	堀 井 克 紀		
授 与 学 位	博士 (工学)		
学 位 授 与 年 月 日	平成 13 年 3 月 26 日		
学位授与の根拠法規	学位規則第 4 条第 1 項		
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻		
学 位 論 文 題 目	立体構造解析に基づく組換え型タンパク質の安定性の研究		
指 導 教 官	東北大学教授 熊谷 泉		
論 文 審 査 委 員	主査 東北大学教授 熊谷 泉	東北大学教授 野澤 庸則	
	東北大学教授 猪股 宏		

論 文 内 容 要 旨

第 1 章 緒言

タンパク質は、その優れた機能を利用して、医薬品、農薬、機能性食品、酵素製剤、機能性素子などに応用されている。しかしながら、天然とは異なる環境で用いる場合が多く、タンパク質の安定性が大きな問題となる場合が少なくない。それゆえ、タンパク質の構造安定性の早急な解明が必要とされており、タンパク質科学の目標の一つでもある。タンパク質の安定性に関して解明すべき課題の一つはタンパク質を構成している個々の残基がタンパク質の安定性にどのような機構で寄与しているかを明らかにすることである。これらの分子論的知見は、安定なタンパク質の合理的設計に重要であるだけでなく、タンパク質の折れたたみ (フォールディング) 機構の理解においても重要である。さらに、分子認識やアロステリック効果などの他の現象にも同じ安定化因子が含まれているため、構造に基づいた合理的医薬分子設計の基盤になり、さらには生命現象の分子論的解明につながるものと考えられる。

α -ラクトアルブミン (α -L A) は哺乳類の乳腺で特異的に発現する分子量約 14,200 の球状カルシウム結合タンパク質である。 α -L A は、酸性 pH、カルシウム除去などの穏やかな変性条件下で、巻戻り反応の間体と同一であるとされているモルテングロビュール状態を形成することが知られおり、タンパク質のフォールディング機構、構造安定化機構を解明するために、各種の物理化学的手法を用いて数多くの研究がなされている。本研究ではヤギ α -L A をモデルタンパク質として用い、実験的アプローチ (安定性測定、X 線結晶構造解析) ならびに理論的アプローチ (自由エネルギー摂動計算) より、タンパク質の安定化機構を多角的に解明することを目的とした。

第 2 章 α -ラクトアルブミンの遺伝子工学的作製と X 線結晶構造解析

～アミノ末端メチオニン残基の安定性への影響～

大腸菌で発現させた組換え型タンパク質は、アミノ末端 (N 末端) にタンパク質合成開始コドンのアミノ酸である Met 残基が付加している場合が多い。これまで、この Met 残基の影響はほとんどないものとされてきた。しかしながら、近年、大腸菌を用いて発現させた組換え型ヤギ α -L A (組換え型-L A) はヤギのミルクから精製した天然のヤギ α -L A (天然-L A) に比べて、3.5 kcal/mol 不安定であることが見い出された。本

章では、組換え型-L Aの遺伝子工学的作製ならびにX線結晶構造解析を行い、天然-L Aの構造と比較することで、N 末端に Met 残基が付加することにより不安定化した原因を立体構造情報に基づいて考察した。

組換え型-L Aの構造は 2.0 Å の高分解能で決定することができた。天然-L Aの構造と比較した結果、全体構造はほとんど同一であり、構造の違いは N 末端近傍に局在化していることが明らかになった。立体構造情報に基づいて、Met 残基の変性のギブス自由エネルギー変化を見積もった結果、天然-L A と組換え型-L A のギブス自由エネルギー差とよい一致を示し、Met 残基が N 末端に付加することで不安定化したのは、主に変性状態における Met 残基のコンフォメーション・エントロピーの増加に起因すると理解された。

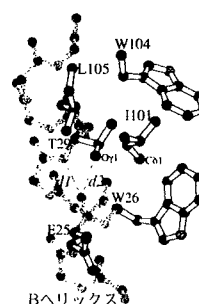
第3章 変異型 α -ラクトアルブミンの安定性およびX線結晶構造解析

～疎水性領域にあるスレオニン残基の安定性への影響～

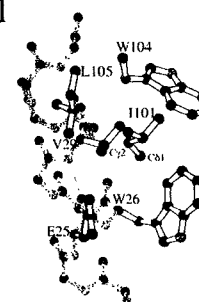
ヤギ α -L A の B ヘリックスの中央に位置する Thr29 は親水性のアミノ酸でありながら疎水性コアの中心にあり、Ile に変異を導入することで大きく構造安定化した。本章ではヤギ α -L A の Thr29Ile 変異体の他に Thr29Val 変異体を作製し、これらの変異体の安定性測定およびX線結晶構造解析を行うことで、タンパク質の安定化機構の解明を目指した。

円二色性を用いて塩酸グアニジンによる変性過程を測定し、その転移曲線を解析した結果、Thr29Val、Thr29Ile 変異体は組換え型-L A (野生型) よりそれぞれ 1.7、3.2 kcal/mol 安定化することが明らかになった。変異体の構造をそれぞれ 1.8、2.0 Å の高分解能で決定し、第2章で決定した野生型の構造と比較した。その結果、パッキングの違いによる構造変化を除いて全体の構造は同じであり、構造の違いは 29 位周辺に局在していることがわかった。野生型と変異体の 29 位周辺の構造を図1に示す。Thr29 側鎖の O-H 基は、同じ B ヘリックス内にある Glu25 主鎖の C=O 基と水素結合を形成していた。変異によりこの水素結合は切断されるが、構造変化は 29 位の χ_1 角度が 20° 程度回転するに留まっていた。また、Thr29Ile 変異体については、Ile101 側鎖の C δ が溶媒側に動くことで Thr よりも大きな Ile 側鎖がタンパク質内部に導入されたことが明らかになった。さらに、疎水性の違いによるエネルギー差を見積もることより、変異体の安定化は主に疎水性の増大に起因すると考えられ、Thr29 側鎖の O-H 基が Glu25 主鎖の C=O 基と形成している水素結合しているものの、Thr29 のタンパク質安定性への寄与は小さいことが推察された。

野生型



Thr29Val



Thr29Ile

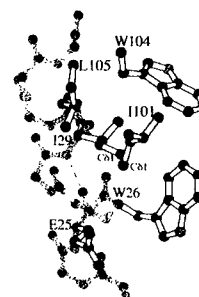


図1 29 位周辺の構造
(d_1 , d_2 は水素結合を示す)

第4章 変異型 α -ラクトアルブミンの分子動力学解析

～疎水性領域にあるスレオニン残基による安定化機構～

本章では、Thr29Val と Thr29Ile 変異体の安定化機構を詳細に調べるために、分子動力学(MD)法に基づく自由エネルギー摂動計算を行い、Thr→Val、Val→Ile 変異に対する天然および変性状態のギブス自由エネルギー変化、 $\Delta G(N)$ 、 $\Delta G(D)$ をそれぞれ求めた。計算した変性のギブス自由エネルギー差、 $\Delta\Delta G(N\rightarrow D)$ は、いずれも実験値と良い一致を示した(表1)。これらの成分分析を行った結果、以下のことが明らかになった。Thr29Val 変異体が野生型よりも安定化(実験値 1.86 kcal/mol)したのは、水和エネルギーの損失による変性状態のギブス自由エネルギーの増加(4.42 kcal/mol)が天然状態のギブス自由エネルギーの増加(2.23 kcal/mol)よりも大きいためである。さらに、天然状態において、野生型の Thr29 側鎖の O-H 基が形成する水素結合は安定性に大きく寄与しているが、不利な Inner 成分(-5.71 kcal/mol)で相殺されていた。この不利な Inner 成分は Thr29 側鎖の O-H 基と Thr29 主鎖の C=O 基との不利な静電相互作用によるものであった。一方、Thr29Ile 変異体が Thr29Val 変異体よりも安定化(実験値 1.37 kcal/mol)したのは、主に天然状態で有利なファンデルワールス相互作用が増加(-1.94 kcal/mol)することに起因することが明らかになった。

これらのことより、 α ヘリックスを構成する Thr 残基が分子内部にあり、 α ヘリックス内でのみ水素結合を形成する場合、Val や Ile に置換すると安定化する可能性が示唆された。

第5章 総括

本章では、各章ごとにまとめを述べた。本研究では、立体構造情報に基づいてタンパク質の安定性研究を行うことで、多くの知見を得ることができた。特に、MD 法に基づく自由エネルギー計算を行うことで有用な知見を得ることができた。

表1 ギブス自由エネルギーの成分分析 (kcal/mol)

	$\Delta G(N)$	$\Delta G(D)$	$\Delta\Delta G(N\rightarrow D)$
Thr→Val			
Total	2.23	4.42	2.19
Inner ^a	-5.71	0.51	6.22
Outer ^b	7.94	3.91	-4.03
vdW (all)	1.35	1.62	0.27
Solvent	-0.06	1.60	1.66
Solute	1.41	0.02	-1.39
EL (all)	6.59	2.29	-4.30
Solvent	-1.91	1.32	3.23
Solute	8.50	0.97	-7.53
Val→Ile			
Total	-1.23	-0.12	1.11
Inner ^a	1.19	0.47	-0.72
Outer ^b	-2.42	-0.59	1.83
vdW (all)	-2.11	-0.46	1.65
Solvent	-0.17	-0.20	-0.03
Solute	-1.94	-0.26	1.68
EL (all)	-0.31	-0.13	0.18
Solvent	0.03	-0.04	-0.07
Solute	-0.34	-0.09	0.25

^a 共有結合長、共有結合角、二面角、1-4 非共有結合、および残基 28、29、30 の 1-5 非共有結合に依存するギブス自由エネルギー変化。

^b 残基 28、29、30 を除く 1-5 非共有結合に依存するギブス自由エネルギー変化。ファンデルワールス(vdW)と静電(EL)相互作用成分からなり、それぞれ溶媒(Solvent)、溶質(Solute)との相互作用成分に分割することができる。

論文審査結果の要旨

タンパク質の分子設計は、その立体構造の構築原理が完全には解明されていないため容易ではなく、医薬品や新規機能性分子の開発には大変な時間と労力を必要とする。それゆえ、タンパク質の構造安定性を決定する機構の解明は極めて重要であり、タンパク質科学の目指す大きな目標の一つでもある。本研究は、このような背景のもと、ヤギ α -ラクトアルブミン (α -L A) をモデルタンパク質として用い、タンパク質工学的手法を用いて変異体を作製し、安定性測定、X線結晶構造解析ならびに分子動力学 (MD) 法に基づく自由エネルギー計算を行うことで、立体構造情報に基づいてタンパク質の安定化機構を解明することを目的としている。本論文は、全編5章からなる。

第1章は序論であり、本研究の背景および目的を述べている。

第2章においては、大腸菌を用いて発現させたヤギ α -L A のX線結晶構造解析を行い、天然のヤギ α -L A の構造と比較することで、アミノ末端に付加した Met 残基がおよぼす構造安定性への影響について考察している。いまや、タンパク質工学はもとより、生命科学分野において、大腸菌を用いて大量にタンパク質を発現させ研究に用いることが多く、Met 残基のアミノ末端への付加は不可避であり、その構造安定性への影響に関する分子論的知見は非常に重要かつ有用である。このようなアミノ末端に付加した Met 残基の影響について詳細に研究を行ったのは初めてであり高く評価できる。

第3章では、ヤギ α -L A の分子内疎水性領域にある Thr29 位に疎水性を高める変異 (Thr29Val、Thr29Ile) を導入し、分光学的手法を用いた安定性測定とX線結晶構造解析を行うことで、タンパク質の構造安定性について考察している。タンパク質の安定性研究において、その立体構造情報は必要不可欠なものであり、高分解能での構造を決定したこと、立体構造情報に基づいた安定性への影響に関する考察は高く評価できる。

さらに第4章では、Thr29Val と Thr29Ile 変異体の安定化機構を詳細に調べるために分子動力学 (MD) 法に基づく自由エネルギー摂動計算を行っている。計算結果は、実験データと非常によい一致を示している。このことは、タンパク質の理論的研究の有効性を示しており評価できる。さらに自由エネルギーの成分分析を行うことで、 α ヘリックス内で水素結合を形成している Thr 側鎖の O-H 基は、同時に主鎖の C=O 基と静電反発しているため、安定性への寄与は小さいことを示した。このことは、タンパク質を設計する上で重要な知見となるものである。

第5章では各章の結果をまとめ、総括している。

以上、本論文では、タンパク質の安定性について多角的に解析することで重要な知見を得ており、生物工学、タンパク質工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として合格と認める。